



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (CCB)  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

ANÁLISE DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DA LECTINA  
EXTRAÍDA DE *Canavalia villosa* (Cvill) EM LINHAGEM  
DE GLIOMA C6 (*Rattus norvegicus*)

Priscilla Gomes Welter

Florianópolis  
2018

Priscilla Gomes Welter

**ANÁLISE DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DA LECTINA  
EXTRAÍDA DE *Canavalia villosa* (Cvill) EM LINHAGEM DE  
GLIOMA C6 (*Rattus norvegicus*)**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Ciências  
Biológicas, Departamento de  
Bioquímica, da Universidade Federal  
de Santa Catarina para a obtenção do  
Grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy  
Leal

Coorientadora: Msc<sup>a</sup>. Ingrid  
Alessandra Victoria Wolin

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Welter, Priscilla Gomes

Análise dos efeitos biológicos da lectina extraída  
de Canavalia villosa (Cvill) em linhagem de glioma  
C6 (Rattus norvegicus) / Priscilla Gomes Welter ;  
orientador, Rodrigo Bainy Leal, coorientadora,  
Ingrid Alessandra Victoria Wolin, 2018.

64 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Glioma. 3. Linhagem  
Celular C6. 4. Lectina. 5. Cvill. I. Leal, Rodrigo  
Bainy. II. Wolin, Ingrid Alessandra Victoria. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em  
Ciências Biológicas. IV. Título.



Priscilla Gomes Welter

**ANÁLISE DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DA LECTINA  
EXTRAÍDA DE *Canavalia villosa* (Cvill) EM LINHAGEM DE  
GLIOMA C6 (*Rattus norvegicus*)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para  
obtenção do Título de Bacharela em Ciências Biológicas e aprovada em  
sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas

Florianópolis, 20 de novembro de 2018.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho  
Universidade Federal de Santa Catarina

Msc<sup>a</sup>. Ana Paula Machado do Nascimento  
Universidade Federal de Santa Catarina



Este trabalho é dedicado aos seus  
futuros leitores.





## AGRADECIMENTOS

Talvez esse espaço tenha sido pensado para agradecer apenas aos colaboradores diretos à execução deste trabalho. Mas neste momento que se aproxima de uma conquista, não poderia eu deixar de mencionar algumas pessoas e entidades que fizeram parte do meu percurso. Saliento que talvez algumas entrelinhas deste agradecimento fiquem claras apenas ao seu destinatário. Sendo assim, meus agradecimentos:

Ao Professor Rodrigo, pela porta que me abriu quando eu, mesmo com pouquíssima experiência, tive a oportunidade de ingressar na equipe do Laboratório de Neuroquímica 3 e desenvolver este trabalho.

À ilustre Ingrid, minha coorientadora, por sua disposição e prontidão em me ajudar a qualquer momento apesar das diversas demandas acadêmicas. Pela pessoa corajosa, justa e (super)dedicada que és. À querida Ana, por sua contribuição experimental e intelectual. Por ser essa pessoa admirável, persistente e de tamanha generosidade. Meninas, esse trabalho não seria possível sem a ajuda de vocês. Agradeço a amizade, o carinho, o tempo que vocês dedicaram à me ajudar. Agradeço também pelos momentos de experimentos em conjunto, de descontrações, reflexões, conselhos, e é claro, pelos momentos de muito café! Minha admiração por vocês!!!

Aos (ex)colegas e amigos do laboratório: Jhônatas, Isa, Josi e Igor. Agradeço pelas técnicas ensinadas, conversas, trocas de ideias, experiências e pela companhia certa de toda quinta ao meio dia nos seminários!

Não poderia deixar de agradecer também ao Gianni. Os meus primeiros passos num laboratório começaram por você quando eu ainda estava no Laboratório de Neuroquímica 1. Obrigada pela paciência, por sua torcida por mim e pela pessoa admirável por todos que és.

À minha mãe, Angelma, não há como agradecer tudo que fez por mim. Serei sempre grata. Apesar das dificuldades, sempre esteve firme nos amparando. Minha gratidão e admiração por abdicar de tantas coisas para me dar a oportunidade de estar concluindo a graduação. Por seu cuidado e preocupação para comigo. Por todos os dias, esperar eu chegar em casa para tomarmos um café e compartilharmos as novidades. Te amo.

Ao meu pai, Rogerio, também agradeço tudo que fez por mim. Pelos ensinamentos de vida e incentivo. Por ser aquela pessoa que me diz “acredite, você é capaz!”. Por, mesmo estando longe, sempre lembrar de verificar como estou. Te amo.

Às minhas queridas irmãs, Rebeca e Raquel, obrigada pelos momentos de descontração e pelas boas risadas pelos quais, pelo menos por um instante, pude me esquecer dos sempre presentes deveres da graduação. Obrigada pela paciência nos momentos em que estive muito atarefada e que não pude ajudar ou dar a devida atenção. Amo vocês!

Ao meu namorado, Felipe, agradeço pelo carinho e companheirismo. Por constantemente me perguntar “o TCC está quase? Precisa de ajuda?” Neste momento em que escrevo os agradecimentos posso finalmente te dizer: está quase! Agradeço por você ser a pessoa que mais conhece sobre cada dia e sentimento meu. Agradeço por ouvir atentamente a cada detalhe do meu percurso, me acompanhar nos momentos difíceis e também por celebrar minhas conquistas. Pelas palavras de força e incentivo, por acreditar que sou capaz naquilo em que nem eu mesmo acredito, pelos momentos de lazer e de ajuda, por me ajudar vislumbrar o futuro. Te amo!

Agradeço aos meus amigos, familiares e colegas. Aos que torcem por mim, aos que fazem parte da minha vida e aqueles que ainda encontrarei nessa jornada.

Agradeço à querida e generosa equipe do Laboratório de Neurometria e Biofeedback (LANEBI) – Prof. Odival, Adri, Mat(Lab) e Adriano - onde hoje faço estágio.

Ao Prof. Benildo e seus alunos do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab), pela disponibilização da matéria base deste trabalho - a lectina Cvill purificada.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), pela disponibilidade dos equipamentos e técnicos.

Ao programa PIBIC financiado pelo CNPq, pelo incentivo à pesquisa e pela bolsa de iniciação científica.

À banca, doutoranda Ana e Prof. Alfeu, por disponibilizarem tempo e dedicação para avaliar este trabalho e pelas demais contribuições.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Aos servidores e professores dessa instituição que nos inspiram.

Aos que lutaram e lutam por acreditar no poder transformador da educação. Agradeço aqueles que, através de suas conquistas, permitiram a existência de uma universidade pública gratuita e de qualidade, proporcionando a mim e a tantos outros chegarem até aqui.

E por tudo, agradeço a Deus.

*Tudo aquilo que o homem ignora, não existe para ele. Por isso, o universo de cada um, se resume no tamanho de seu saber.”*

*(Albert Einstein)*

## RESUMO

Os gliomas representam tumores cerebrais que têm origem nas células gliais ou precursores gliais. Estes tumores apresentam rápida proliferação e grande resistência aos mecanismos de morte celular, causando elevada mortalidade. Os tratamentos disponíveis ainda são muito limitados, invasivos e pouco seletivos. Para tanto, novas estratégias de tratamento têm sido investigadas. Lectinas são proteínas que reconhecem e se ligam a carboidratos com alta especificidade, desencadeando diversos efeitos biológicos, incluindo ações antitumorais. Notavelmente, células tumorais podem apresentar alteração no perfil de glicanos expressos na sua superfície, evento que pode torna-las alvo seletivo para ação de lectinas. No presente estudo foi avaliado o potencial citotóxico da lectina Cvill, com afinidade por glicose/manose, purificada a partir das sementes de *Canavalia villosa*. Para esta abordagem foram utilizadas células tumorais da linhagem C6 de ratos (*Rattus norvegicus*) como modelo *in vitro* de glioma. As células foram incubadas por períodos de 1, 3, 6, 12, 24 e 48h com a lectina Cvill nas concentrações de 10, 30, 50 e 100µg/mL. Os resultados indicaram dois efeitos antitumorais importantes induzidos pelo tratamento com Cvill: morte celular e inibição parcial da migração/proliferação. Neste sentido foi observado diminuição da viabilidade celular de maneira tempo e concentração-dependente, iniciando a partir de 6h, na concentração de 30µg/mL. Esta ação foi dependente do domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD) e da estrutura terciária da lectina. Da mesma forma a morfologia celular mostrou alterações evidentes como perda de prolongamentos citoplasmáticos e degradação da matriz extracelular. O tratamento intermitente com a lectina revelou resistência celular na dose de 30µg/mL. Em relação aos possíveis mecanismos de morte celular induzido por Cvill foi observado aumento precoce (6-12h) de organelas vesiculares ácidas e de LC3II, indicando autofagia. Além disso, um aumento da marcação de fosfatidilserina por anexina V em 6h de tratamento, indica a indução de apoptose. Nesse mesmo período, também foi verificado diminuição do potencial da membrana mitocondrial comprometendo a maquinaria energética da célula. Embora mais estudos sejam necessários para elucidar os mecanismos moleculares e alvos da lectina Cvill sobre as células de glioma, os resultados apontam um potencial para aplicação desta lectina com vista a terapia antitumoral.

**Palavras-chave:** Glioma. Linhagem Celular C6. Lectina. Cvill.

## ABSTRACT

Gliomas represent brain tumors originate in glial cells or glial precursors. These tumors present rapid proliferation and high resistance to mechanisms of cell death, causing high mortality. Available treatments are still very limited, invasive and poorly selective. Therefore, new treatment strategies have been investigated. Lectins are proteins that recognize and bind to carbohydrates with high specificity, triggering various biological effects, including antitumor actions. Notably, tumor cells may have a change in the profile of glycans expressed on their surface, an event that may make them a selective target for lectin action. In the present study the cytotoxicity potential of the Cvill, a mannose/glucose binding lectin, purified from *Canavalia villosa* seeds was evaluated. For this approach, rat C6 line (*Rattus norvegicus*) tumor cells were used as the *in vitro* model of glioma. Cells were incubated for periods of 1, 3, 6, 12, 24 and 48h with Cvill lectin at concentrations of 10, 30, 50 and 100µg/mL. The results indicated two important antitumor effects induced by Cvill treatment: cell death and partial inhibition of migration/proliferation. In this sense, a decrease in cell viability was observed in a time and concentration-dependent manner, starting at 6 h at a concentration of 30µg/mL. This action was dependent on the carbohydrate recognition domain (CRD) and the lectin tertiary structure. In the same way the cellular morphology showed evident alterations like loss of cytoplasmic prolongations and degradation of the extracellular matrix. Intermittent treatment with the lectin revealed cell resistance at the dose of 30µg/mL. Regarding the possible mechanisms of cell death induced by Cvill, early enlargement (6-12h) of acidic vesicle organelles and LC3II, indicating autophagy, was observed. In addition, an increase in the labeling of phosphatidylserine by annexin V within 6 h of treatment indicates the induction of apoptosis. In the same period, it was also observed a decrease in the mitochondrial membrane potential compromising the energetic machinery of the cell. Although more studies are needed to elucidate the molecular mechanisms and targets of Cvill lectin on glioma cells, the results point to a potential for the application of this lectin for antitumor therapy.

**Keywords:** Glioma. C6 Cell Line. Lectin. Cvill.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Linhagem celular no cérebro e tipos celulares que podem gerar gliomas malignos.....	25
<b>Figura 2</b> - Representação do processo autofágico .....	31
<b>Figura 3</b> - <i>Canavalia villosa</i> .....	34
<b>Figura 4</b> - Diagrama do ensaio de resistência.....	38
<b>Figura 5</b> - Efeito da lectina Cvill na viabilidade celular.....	43
<b>Figura 6</b> - Morfologia das células C6 após tratamento.....	44
<b>Figura 7</b> - Viabilidade Celular após tratamento com Cvill desnaturada ou bloqueada .....	46
<b>Figura 8</b> - Resistência ao tratamento intermitente .....	47
<b>Figura 9</b> - Incorporação de Iodeto de Propídio e formação de organelas vesiculares ácidas .....	49
<b>Figura 10</b> - Efeito citostático na migração/proliferação .....	50
<b>Figura 11</b> - Indução de autofagia e apoptose .....	51
<b>Figura 12</b> - Expressão proteica de LC3 e incremento de OVAs .....	52
<b>Figura 13</b> - Alteração do potencial de membrana mitocondrial .....	53





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ALA - Ácido 5-aminolevulínico  
AKT – Proteína quinase B  
ANOVA - Análise de variância  
ATCC - American Type Culture Collection  
Atg – Do inglês *autophagy-related gene*  
ATP -Trifosfato de adenosina  
BioMol-Lab - Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas  
CaBo – Lectina de *Canavalia bonariensis*  
CaCl<sub>2</sub> - Cloreto de cálcio  
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
ConA - Concanavalina A, lectina de *Canavalia ensiformis*  
ConBr - Lectina de *Canavalia brasiliensis*  
ConV – Lectina de *Canavalia virosa*  
CR – Cromatina  
CRD - Domínio de Reconhecimento a Carboidrato  
Cvill – Lectina de *Canavalia villosa*  
DLL – Lectina de *Dioclea lasiocarpa*  
DlyL – Lectina de *Dioclea lasiophylla*  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
DVL – Lectina de *Dioclea violácea*  
FCCP – Carbonil cianeto de p-trifluormetoxifenilhidrazona  
FITC - Isotiocianato de fluoresceína  
GBM - Glioblastoma Multiforme  
GFAP - Proteína glial fibrilar ácida  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogenio  
HBSS - Solução Salina Balanceada de Hank  
HEPES - Ácido n-2-hidroxietilpiperazina  
INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva  
IP – Iodeto de Propídio  
JC-1 - Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianeto.  
KCl- Cloreto de Potássio  
kDa – Kilodaltón  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Fosfato monopotássico  
LA – Laranja de Acridina  
LC3-I - Cadeia leve 3 da Proteína 1 associada a Microtúbulos forma I  
LC3-II - Cadeia leve 3 da Proteína 1 associada a Microtúbulos forma II  
LCD – do inglês *Linker cell-type death*

MAPK - Proteína cinase ativada por mitógeno  
MTT - Sal de tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – Fosfato dissódico  
NaCl – Cloreto de Sódio  
 $\text{NaHCO}_3$  – Bicarbonato de sódio  
NETosis – do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*  
NSCs - Células Tronco Neurais  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
OPCs – Células Precursoras de Oligodendrócitos  
OVAs – Organelas Vesiculares Ácidas  
PBS - Tampão fosfato-salino  
PIBIC - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
POG – Privação de Oxigênio e Glicose  
RPM – Rotações por minuto  
SDS - Dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS  
SFB - Soro fetal bovino  
SNC - Sistema Nervoso Central  
TMZ – Temozolomida  
UFC – Universidade Federal do Ceará  
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

## LISTA DE SÍMBOLOS E MEDIDAS

$\mu$  - Micro

L – Litros

$\mu$ L – Microlitro

g – Grama

$\mu$ g – Micrograma

M – Molar

mM- Milimolar

nm- Nanômetros

$^{\circ}$ C - Graus Célsius

$\alpha$  - Alfa

$\beta$  – Beta

$\gamma$  - Gamma

$\Delta\Psi_m$  - Potencial de membrana mitocondrial



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1.1	CÂNCER.....	23
<b>1.1.1</b>	<b>Tumores no SNC: Glioma .....</b>	<b>24</b>
1.1.1.1	Linhagens celulares.....	26
1.2	MORTE CELULAR .....	28
<b>1.2.1</b>	<b>Apoptose.....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Autofagia.....</b>	<b>29</b>
1.3	GLICANOS E LECTINAS .....	31
<b>1.3.1</b>	<b>Lectina extraída de <i>Canavalia villosa</i>: Cvill.....</b>	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE .....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
4.1	CULTURA DE CÉLULAS.....	36
4.2	LECTINAS: PURIFICAÇÃO, DISSOLUÇÃO, DILUIÇÃO, DESNATURAÇÃO E BLOQUEIO.....	36
4.3	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E MICROSCOPIA.....	36
4.4	ENSAIO DE RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO .....	37
4.5	ENSAIO DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COM LARANJA DE ACRIDINA .....	38
4.6	ENSAIO DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COM IODETO DE PROPÍDIO .....	38
4.7	ENSAIO DE MIGRAÇÃO/PROLIFERAÇÃO .....	39
4.8	ANÁLISE DE MORTE CELULAR APOPTÓTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	39
4.9	DETECÇÃO DA PROTEÍNA AUTOFÁGICA LC3 POR <i>WESTERN BLOT</i> .....	40
<b>4.9.1</b>	<b>Preparação de amostras.....</b>	<b>40</b>

<b>4.9.2</b>	<b>Separação das proteínas em gel SDS-PAGE .....</b>	<b>41</b>
4.10	MEDIDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL COM A Sonda JC-1.....	41
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
5.1	Cvill DIMINUI A VIABILIDADE CELULAR E CAUSA MUDANÇAS MORFOLÓGICAS NA LINHAGEM C6.....	43
5.2	O EFEITO CITOTÓXICO DE Cvill SOBRE A LINHAGEM C6 É DEPENDENTE DE SUA ESTRUTURA TERCIÁRIA E DE SEU CRD.....	45
5.3	A LINHAGEM C6 APRESENTA RESISTÊNCIA FRENTE AO TRATAMENTO COM 30µg/mL DE Cvill .....	46
5.4	Cvill POSSUI EFEITO CITOSTÁTICO NA LINHAGEM C6.....	49
5.5	Cvill INDUZ APOPTOSE E AUTOFAGIA NA LINHAGEM C6.....	50
5.6	Cvill DIMINUI O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi_m$ ) NA LINHAGEM C6 .....	53
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER

O equilíbrio entre a morte e a sobrevivência celular é essencial para a manutenção da homeostase. Quando este equilíbrio é perdido aparecem doenças e entre elas destaca-se o câncer (GUDIPATY *et. al.*, 2018).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer é uma denominação para um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2018a).

Neste contexto, torna-se importante a diferenciação de alguns conceitos comumente citados tais como tumores, neoplasias e o câncer. Os tumores referem-se a um aumento de volume em uma parte qualquer do corpo. Quando o tumor é causado pelo aumento do número de células então é chamado de neoplasia. As neoplasias podem ser diferenciadas entre benignas e malignas que, por vezes, são também chamadas de tumores benignos e malignos respectivamente. O câncer refere-se às neoplasias malignas - ou tumores malignos (HRUBAN *et. al.*, 2018; INCA, 2018b).

Os tumores foram segregados em duas categorias principalmente pelo grau de agressividade de seu crescimento. Os benignos são aqueles que crescem localizados dentro de uma cápsula de tecido conectivo impedindo sua invasão a tecidos adjacentes. Já os tumores malignos são aqueles que invadem tecidos próximos ou que se espalham (metástases), formando tumores secundários a partir do tumor fundador ou primário (WEINBERG, 2008).

Hanahan e Weinberg (2000) sugeriram seis capacidades biológicas que são compartilhadas por todos, ou quase todos, os tumores malignos. São elas: sustentar a sinalização proliferativa, resistir à morte celular, induzir angiogênese, replicar de maneira ilimitada (imortalidade), ativar a invasão e metástase e evitar supressores do crescimento (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Com tantas características que divergem de uma célula normal espera-se que o metabolismo dessas células também esteja alterado

No interior de uma massa tumoral, podemos encontrar uma situação de hipóxia e, portanto, células utilizando o metabolismo anaeróbico. No entanto, Otto Warburg, contemplado com o Nobel em 1931, observou que mesmo na presença de oxigênio, as células cancerosas continuavam utilizando esse mecanismo. Ou seja, em vez de

processar a glicose para piruvato e depois encaminhá-lo para a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, as células cancerosas processavam a glicose para piruvato e depois ocorria a fermentação para lactato (HANAHAAN; WEINBERG, 2011).

Esse efeito ficou conhecido como “Efeito Warburg” e é aparentemente contra intuitivo sob o ponto de vista energético (HANAHAAN; WEINBERG, 2011). O rendimento é de apenas 2 mols *versus* 38 mols de ATP por mol de glicose para oxidação aeróbica (MARZZOCO; TORRES, 2007); o que contrasta com a alta taxa de proliferação e, conseqüentemente, de energia que este processo requer (HANAHAAN; WEINBERG, 2011).

Muitas hipóteses de como o Efeito Warburg beneficia as células cancerosas foram levantadas, mas essa continua sendo uma questão não bem esclarecida (LIBERTI; LOCASALE, 2016). Apesar da ênfase desse tipo de metabolismo para as células cancerosas, é importante destacar que em uma massa tumoral, pode haver subpopulações com um metabolismo diferenciado, inclusive importando o lactato produzido por suas vizinhas como fonte de energia (HANAHAAN; WEINBERG, 2011).

Em um olhar mais profundo sob a célula, no seu núcleo, podemos encontrar a resposta do porquê uma célula saudável se torna maligna. Essa passagem, chamada de transformação, é decorrente, em grande parte, de sucessivas alterações no material genético da célula, chamadas de mutações, que conferem vantagem seletiva a célula e, após sucessivas expansões clonais, eventual dominância no tecido em que se encontra (HANAHAAN; WEINBERG, 2011).

Importante destacar que as neoplasias são denominadas de acordo com o tipo de célula e tecido do qual foi originado, conhecendo-se mais de 200 tipos. Os tumores primários do sistema nervoso central (SNC) contribuem significativamente na morbidade de todos os grupos de idade, representando 20% das neoplasias em crianças e 2% em adultos (INCA, 2017). Os tumores cerebrais são classificados como um dos tipos de neoplasia com maiores desafios na sua terapia (RIOS-MARCO *et. al.*, 2015), sendo os gliomas responsáveis pela maioria dos tumores primários do SNC (CHERRY; STELLA, 2014).

### **1.1.1 Tumores no SNC: Glioma**

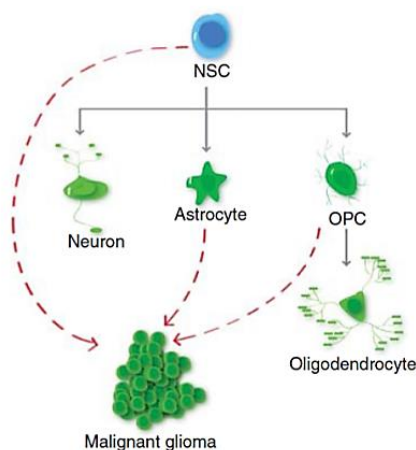
Os tumores primários do sistema nervoso central (SNC), apesar de não serem os mais comuns, são os que apresentam os piores prognósticos (ROUSE *et al.*, 2016). Para o Brasil, estimam-se 5.810



casos novos de câncer no SNC em homens e 5.510 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019 (INCA, 2017).

Os tumores no SNC ganharam uma nova classificação pela OMS em 2016 substituindo sua antecessora de 2007. Pela primeira vez foram adicionados parâmetros moleculares às características histológicas já utilizadas para diferenciar os diversos tumores do SNC. O uso integrado de parâmetros fenotípicos e genotípicos aumenta o grau de objetividade e de precisão seja no diagnóstico ou na pesquisa (LOUIS *et al.*, 2016).

Dentre os tumores cerebrais primários malignos, cerca de 70% são gliomas (OHGAKI, 2009; OSTROM *et al.* 2016). Os gliomas são tumores que têm origem em células gliais ou em seus precursores conforme representado na figura a seguir (ZONG *et al.*, 2015).



**Figura 1 – Linhagem celular no cérebro e tipos celulares que podem gerar gliomas malignos.** As células-tronco neurais (NSCs - *Neural Stem Cells*) dão origem a neurônios, astrócitos e células precursoras de oligodendrócitos (OPCs – *Oligodendrocyte Precursor Cells*) que, por sua vez, podem diferenciar-se em oligodendrócitos. Linhas vermelhas pontilhadas retratam os tipos de células que poderiam servir como a célula de origem dos gliomas malignos. Outras células progenitoras intermediárias que compõe essa linhagem celular foram ocultadas. **Fonte:** ZONG e colaboradores (2015)

Os gliomas variam quanto ao seu grau de malignidade. Dentre os diversos subtipos, o glioblastoma (GBM) é o mais agressivo e infelizmente o mais frequente também (OHGAKI, 2009; OSTROM *et al.* 2016). A sobrevida média global de pacientes com GBM primário

(que corresponde cerca de 90% dos casos) recebendo o tratamento usual é de apenas 15 meses (OHGAKI; KLEIHUES, 2013).

Os sintomas dos gliomas dependem da localização do tumor no cérebro. Os mais comuns incluem: dores de cabeça, convulsões, alterações cognitivas e de personalidade, perda de equilíbrio, diminuição sensorial e incontinência (WOJTON *et al.*, 2015).

Fatores ambientais e genéticos podem estar envolvidos no desenvolvimento dos gliomas (JURATLI; SCHACKERT; KREX, 2013). Para o GBM, o único fator ambiental já associado de forma consistente é a exposição a radiações ionizantes. Foi percebido que pessoas com gliomas menos agressivos quando expostos ao tratamento com radiação apresentavam risco maior de desenvolver GBM (ADAMSON *et al.*, 2009; IMMANUEL *et al.*, 2017).

Os pacientes com gliomas malignos são submetidos à remoção cirúrgica seguido por tratamentos de radioterapia e quimioterapia com temozolomida (TMZ). No entanto, esses tratamentos conferem apenas um benefício paliativo (JURATLI; SCHACKERT; KREX, 2013).

Os gliomas tem uma série de características que dificultam o sucesso do tratamento. Diferente dos tumores periféricos, raramente ocorre metástase para fora do SNC. No entanto, os gliomas com alto grau de malignidade são altamente infiltrativos, o que faz com que suas bordas não sejam bem definidas e consequentemente a ressecção cirúrgica não é completa, levando inevitavelmente a recorrência do tumor (PAW *et al.*, 2015; SATHORNSUMETEE; RICH, 2006).

Para a ressecção cirúrgica dos gliomas malignos, devido à característica bastante infiltrava e de se parecer com o tecido cerebral normal, alguns hospitais têm utilizado o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), composto que diferencia o tumor através da fluorescência. Os pacientes ingerem o composto antes da cirurgia e isso aumenta a precisão da ressecção levando a uma melhora da sobrevida dos pacientes (STUMMER *et al.*, 2006).

#### 1.1.1.1Linhagens celulares

Graças a uma das capacidades das células cancerosas, a imortalidade, foi possível estabelecer linhagens celulares. A primeira delas em 1951, após a paciente Henrietta Lacks com câncer cervical ter seu tumor removido. Algumas células da massa tumoral foram removidas e observou-se que elas se multiplicavam extremamente rápido - a cada 24h - algo nunca observado antes. Desde então suas células, chamadas células HeLa, são amplamente cultivadas. A partir de

então, outras linhagens foram estabelecidas a partir dos mais diversos tumores (MASTERS, 2002).

As linhagens celulares são utilizadas não somente em pesquisas sobre o câncer, mas em outras pesquisas biomédicas e até mesmo no desenvolvimento de vacinas. Com o avanço do entendimento sobre as diferenças genéticas e bioquímicas das células tumorais foi possível imortalizar células normais com genes virais, cujos produtos ligam e inibem proteínas-chave, tais como p53 e retinoblastoma (MASTERS, 2002).

No que se refere aos gliomas, a linhagem celular C6 tem sido utilizada rotineiramente como um bom modelo *in vitro* (SIBENALLER *et al.*, 2005; YING *et al.*, 2017).

A linhagem celular C6 foi obtida a partir de um tumor glial de rato induzido por N-nitrosometilureia por Benda e colaboradores (1968). Dos tumores induzidos foram obtidas cepas clonais que foram cultivadas e estudadas quanto ao seu teor de S-100, proteína presente no cérebro dos vertebrados, e sua capacidade de crescer como um tumor quando injetado novamente em ratos. De todas as cepas obtidas, apenas uma apresentou quantidades significativas de S-100, além de conseguir crescer como um tumor, aquela que havia sido denominada C6 (BENDA *et al.*, 1968).

Quanto a doença que essa linhagem representa, a *American Type Culture Collection* também a classificou como um glioma e o tipo celular como uma célula glial (ATCC, 2018).

As células C6 possuem características que as diferenciam das células provenientes dos gliomas malignos humanos (GROBBEN; DEYN; SLEGGERS, 2002; JACOBS *et al.*, 2011). O gene supressor de tumor p53, que é um dos genes mais frequentemente mutados nos tumores e também no GBM, não se encontra mutado nas células C6. Por outro lado, um gene supressor de tumor comum, p16, tem uma alta taxa de mutação no GBM e também nas células C6 (JACOBS *et al.*, 2011). Uma característica imunocitoquímica que vale citar é que C6 não expressa a proteína ácida fibrilar glial - GFAP (GROBBEN; DEYN; SLEGGERS, 2002; JACOBS *et al.*, 2011).

Importante vantagem da utilização da linhagem C6 é a possibilidade de utilizá-la em testes *in vivo* implantando as células em ratos sem ocorrer rejeição (JACOBS *et al.*, 2011).

## 1.2 MORTE CELULAR

Algo tão importante para a homeostase quanto é a morte celular não poderia ocorrer apenas de uma maneira. De fato, existem vários tipos de morte celular que podem ser induzidos fisiologicamente ou por fármacos. Já foi observado que alguns compostos antitumorais desencadeiam mais de um tipo de morte na mesma linhagem celular (YU *et. al.*, 2017).

As vias convencionais de morte celular incluem apoptose, necrose e autofagia, sendo que esta última pode promover tanto a sobrevivência quanto a morte celular. Além disso, novos tipos de morte celular têm sido descritos e incluem: necroptose, piroptose, ferroptose, fagoptose, entose, cornificação, parthanatos, morte celular do tipo LCD (*Linker cell-type death*) e NETosis (*Neutrophil Extracellular Traps*). A importância de estudar os diversos tipos de morte celular reside no fato de que as estratégias terapêuticas contra o câncer geralmente incluem induzir um mecanismo de morte (GUDIPATY *et. al.*, 2018).

### 1.2.1 Apoptose

Controlada por uma via bioquímica bem definida, a apoptose é realizada por enzimas proteolíticas denominadas caspases (GUDIPATY *et. al.*, 2018; SUN; MONTELL, 2017). O estudo da apoptose rendeu o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina no ano de 2002 aos pesquisadores Sydney Brenner, John Sulston e Robert Horvitz (CURTIN; COTTER, 2003).

A apoptose desempenha um papel fundamental no desenvolvimento embrionário. Exemplos clássicos são a remoção das membranas interdigitais na formação dos membros e remoção de neurônios excedentes (LINDSTEN *et. al.*, 2000; DEKKERS; NIKOLETOPOULOU; BARDE, 2013). Mas sua importância continua na vida adulta. Em um adulto saudável cerca de 10 milhões de células sofrem apoptose diariamente (CURTIN; COTTER, 2003).

No sistema imunológico, os linfócitos autoreativos são removidos no timo por apoptose, evitando sua liberação que poderia gerar reações autoimunes. Na prevenção de doenças, este processo remove células com DNA danificando evitando os tumores. Diversos outros exemplos também poderiam ser citados (FEIG; PETER, 2007; ROOS; THOMAS; KAINA, 2015).

Geralmente a apoptose ocorre por duas vias: a via intrínseca e extrínseca, cujo processo de morte é desencadeado por sinais de estresse

internos ou externos a célula respectivamente, sendo a ativação da caspase-3 um ponto em comum entre as duas vias (TAIT; GREEN, 2012; GREEN; LLAMBI, 2015; BOATRIGHT; SALVESEN, 2003).

Um dos eventos iniciais desse tipo de morte celular é a externalização da fosfatidilserina, um lipídio que passa da camada interna para a camada externa da membrana plasmática (PALMA, 2005). A fosfatidilserina externalizada serve como um sinal para que os fagócitos removam a célula que sinalizou seu processo de morte programada (SEGAWA; NAGATA, 2015).

Na pesquisa, a externalização da fosfatidilserina é usada como um indicador de apoptose sendo detectada pela Anexina V conjugada com o fluorocromo FITC. Outro marcador utilizado conjuntamente nos estudos da apoptose é o Iodeto de Propídio, mas este é apenas detectado nos estágios tardios da apoptose, fase em que ocorre o aumento da permeabilidade de membrana plasmática permitindo ao corante entrar na célula (PALMA, 2005).

## **1.2.2 Autofagia**

Durante a década de 60, pesquisadores observavam que a célula poderia degradar e reciclar seu próprio conteúdo envolvendo-o em membranas e sendo transportados para o lisossomo para degradação. No entanto, pouco se conhecia sobre os detalhes deste processo. No início dos anos 90, Yoshinori Ohsumi usou leveduras para identificar os genes envolvidos na autofagia e elucidar os mecanismos deste processo, mostrando ainda que uma maquinaria similar é usada em nossas células. Com estes estudos, Ohsumi foi contemplado com o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina no ano de 2016 (NOBEL, 2016).

A autofagia pode ser vista como um processo adaptativo que ocorre em resposta a diferentes formas de estresse, tais como a privação de nutriente e hipóxia. A atividade autofágica modula muitas patologias, incluindo doenças neurodegenerativas, câncer e doenças infecciosas, podendo levar as células a sua manutenção e sobrevivência ou atuar como um tipo de morte celular (DIKIC; ELAZAR, 2018; DERETIC; KLIONSKY, 2008).

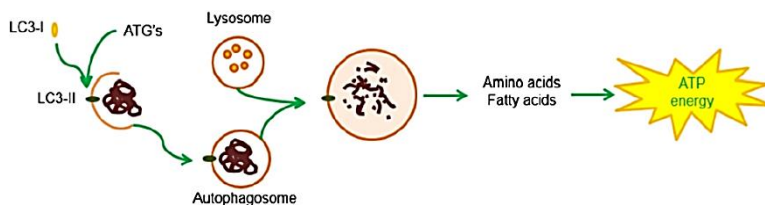
Deretic e Klionsky (2008), apontaram algumas estratégias terapêuticas através da manipulação da autofagia tais como: 1) inibição da autofagia em células cancerosas, para prevenir que essas células consumam o conteúdo citoplasmático, evitando sua sobrevivência em ambientes com falta de nutrientes e oxigênio; 2) estímulo da autofagia em células em risco de câncer, para diminuir as chances de mutações e

tumores secundários, considerando que baixo nível de autofagia favorece a eliminação de moléculas nocivas que induzem danos/mutações no DNA.

Quanto à maneira que é entregue uma carga citoplasmática ao lisossomo, podemos classificar a autofagia em macroautofagia (muitas vezes denominada simplesmente de autofagia), microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. A macroautofagia envolve a formação dos autofagossomos que se fundem aos lisossomos, a microautofagia refere-se ao processo onde as proteínas citosólicas são diretamente englobadas nos lisossomos, e a autofagia mediada por chaperonas utiliza chaperonas citosólicas para entregar proteínas para a superfície dos lisossomos. Quanto ao conteúdo a ser degradado, a autofagia pode ser classificada como, mitofagia, pexofagia e lipofagia representando a degradação lisossomal de mitocôndrias, peroxissomas e lipídios, respectivamente (COOPER, 2018).

O processo da (macro)autofagia pode ser resumido da seguinte maneira: uma membrana de isolamento, também chamada de fagóforo, inclui uma pequena porção de material citoplasmático a ser degradado. A membrana de isolamento é selada formando uma vesícula de membrana dupla denominada “autofagossomo”. O autofagossomo se funde com a membrana do lisossomo tornando-se um autolisossomo, dentro do qual o material é degradado por enzimas lisossomais (LIN; BAEHRECKE, 2015; DIKIC; ELAZAR, 2018).

A proteína LC3 (cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos) é equivalente a proteína Atg 8 em leveduras. Ela existe em duas formas: LC3-I e seu derivado proteolítico LC3-II (16 e 14 kDa, respectivamente), que estão localizados no citosol (LC3-I) ou na membrana dos autofagossomos (LC3-II) (KABEYA *et. al.*, 2000). Nas membranas autofágicas, a conversão de LC3-I em LC3-II é uma assinatura característica e por isso usada para quantificar os níveis de autofagia nas células (DIKIC; ELAZAR, 2018).



**Figura 2 - Representação do processo autofágico.** No interior da célula, LC3-I é ativada na presença de proteínas relacionadas à autofagia (ATGs) para iniciar a formação de autofagossomo, ocorre o sequestro de componentes citosólicos, a dupla membrana é selada, o autofagossomo se funde com o lisossomo formando autolisossomo onde ocorre a degradação do conteúdo celular. Nesse esquema, o conteúdo da degradação é utilizado para manter a produção de adenosina trifosfato (ATP) e, assim, manter a sobrevivência celular. No entanto, o processo de autofagia também poderia estar ocorrendo direcionado a morte celular.

**Fonte:** Heras-Sandoval e colaboradores (2014)

É importante ressaltar que apesar de encontrarmos comumente a autofagia e a apoptose sendo analisadas e descritas separadamente elas podem estar interconectadas. Isso é possível pois estas duas vias compartilham algumas proteínas reguladoras, o envolvimento de certas organelas e podem responder a estresses semelhantes (CHAABANE *et.al.*, 2013; COOPER, 2018; DERETIC; KLIONSKY, 2008).

### 1.3 GLICANOS E LECTINAS

Por muito tempo, os investigadores no mundo todo voltaram suas atenções para três das quatro principais classes de moléculas orgânicas presentes nos sistemas vivos: os ácidos nucleicos, as proteínas e os lipídios. Apenas recentemente os carboidratos receberam maior atenção através do campo da glicobiologia. Uma de suas áreas refere-se ao papel da glicobiologia na saúde e na doença, particularmente na terapêutica do câncer (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

É descrito que quase todos os tipos de células cancerosas possuem alterações nos seus padrões de glicosilação de superfície celular quando comparados com as células homologas normais. Como exemplo podemos citar os gangliosídeos como o GD3, que são abundantemente exibidos em diversos tumores, inclusive em gliomas (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Diante disso, um aspecto para o qual novas terapias têm se voltado diz respeito a compostos com a capacidade de reconhecer padrões alterados de glicanos de superfície e induzir morte tumoral seletiva. Tais características podem ser encontradas em proteínas denominadas lectinas (AOYANAGI *et al.*, 2010; LICHTENSTEIN; RABINOVICH, 2013).

Lectinas são proteínas de origem não-imune distribuídas em diversos organismos. O requisito para que uma proteína seja chamada de lectina é a presença de pelo menos um domínio não catalítico, que reconheça e se ligue reversivelmente a um carboidrato específico. Este domínio é denominado de domínio de reconhecimento a carboidrato ou CRD (VAN DAMME *et. al.*, 1998; NELSON; COX, 2011).

A ênfase em “origem não-imune” que compõe a descrição das lectinas serve para distingui-las dos anticorpos anticarboidratos. Muitas lectinas são encontradas em organismos que não sintetizam imunoglobulinas, tais como plantas e bactérias. Além disso, em contraste com os anticorpos que são estruturalmente semelhantes entre si, as lectinas são estruturalmente diversas (LIENER; SHARON; GOLDSTEIN, 1986).

Apesar da ampla distribuição, as lectinas foram primeiramente estudadas em plantas. Nelas, podem possuir papéis antivirais, antibacterianos, antifúngicos, inseticida e até mesmo apresentar toxicidade para animais superiores baseado na capacidade das lectinas de se ligarem a glicoconjugados de outros organismos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

A primeira descrição de uma lectina foi em 1888 quando Peter Hermann Stillmark descreveu a propriedade hemaglutinante da ricina, uma lectina tóxica presente nas sementes de mamona (*Ricinus communis*) (BIES; LEHR; WOODLEY, 2004; VAN DAMME *et. al.*, 2001)

Apesar da atividade hemaglutinante ser descrita em lectinas, essa não é uma característica presente em todas elas. Para que a aglutinação de eritrócitos ocorra é necessário a presença de mais de um CRD, sendo então chamadas de hololectinas. Já as lectinas que possuem apenas um CRD são chamadas de merolectinas e as que possuem pelo menos um CRD e mais um domínio catalítico são chamadas quimerolectinas (LIENER; SHARON; GOLDSTEIN, 1986; PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Nos humanos, as lectinas endógenas estão envolvidas em uma enorme variedade de processos biológicos. Entre esses processos podemos citar o reconhecimento célula-célula, interações célula-matriz



extracelular (MEC), interações entre gametas na fertilização, desenvolvimento embrionário, crescimento celular, diferenciação celular, sinalização celular, adesão e migração celular, apoptose, imunomodulação e inflamação, interações de patógenos, dobramento e roteamento de glicoproteínas, indução mitogênica, entre outros (NELSON; COX, 2011; GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Apesar de ser encontrada em diversos organismos, as lectinas mais investigadas são lectinas de plantas, em particular da família das leguminosas (Fabaceae). As lectinas de leguminosas representam um grupo de proteínas estruturalmente semelhantes, mas com especificidades distintas para carboidratos (LI *et al.*, 2011; CAVADA *et al.*, 2001).

Concanavalina A (ConA), das sementes de *Canavalia ensiformis*, foi a primeira lectina a ser isolada, sequenciada e a ter sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raios-x. Sua especificidade é por manose e glicose. Além dos diversos estudos bioquímicos, biofísicos e estruturais realizados com ConA, uma atenção crescente por sua atividade antitumoral em relação a vários tipos de células cancerosas fazem de ConA uma das lectinas melhor investigada (LI *et al.*, 2011; CAVADA *et al.*, 2001).

Em relação a ação antiglioma, tem sido relatado que células de glioblastoma humano da linhagem U87 tratadas com ConA apresentam um aumento significativo de autofagia relacionado a morte celular (PRATT; ROY; ANNABI, 2012; PRATT; ANNABI, 2014).

Além disso, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, tem demonstrado que outras lectinas purificadas de sementes de plantas leguminosas, tais como: *Canavalia virosa* (ConV), *Dioclea lasiocarpa* (DLL), *Canavalia bonariensis* (CaBo), *Dioclea lasiophylla* (DlyL), *Canavalia ensiformes* (ConA), *Dioclea violacea* (DVL), apresentam potencial antiglioma em diferentes graus sob a linhagem celular C6 (OSTERNE *et.al.*, 2017; NASCIMENTO *et. al.*, 2017; CAVADA *et.al.*, 2018; LEAL *et. al.*, 2018; NASCIMENTO *et.al.*, 2018).

### 1.3.1 Lectina extraída de *Canavalia villosa*: Cvill

*Canavalia villosa* pertence à família Fabaceae, tribo Phaseoleae e gênero *Canavalia*. Seu hábito é de uma trepadeira, possui folhas alternas, corola com 5 pétalas desiguais em tamanho e que variam de uma cor esbranquiçada até roxa, seu fruto é um legume (Figura 3). É tipicamente encontrada desde a América Central até o noroeste da

América do Sul (LOSSIO *et al.*, 2017; ALIPI; PICHARDO; VIBRANS, 2018).



**Figura 3 – *Canavalia villosa*.** Fotografias da leguminosa *Canavalia villosa* mostrando seu hábito (painel esquerdo superior), inflorescência (painel esquerdo inferior), flor (painel direito superior) e frutos (painel direito inferior).

**Fonte:** Montiel, 2018

Recentemente, a lectina das sementes de *Canavalia villosa* foi isolada por Lossio e colaboradores (2017). Tipicamente a nova lectina recebeu o nome conforme as iniciais da espécie: Cvill.

Cvill é composta por três cadeias polipeptídicas: uma cadeia  $\alpha$  de 25.6kDa, uma cadeia  $\beta$  de 12.9kDa e uma cadeia  $\gamma$  de 12.6 kDa. A nova lectina apresenta especificidade para D-glicose,  $\alpha$ -metil-D-manosídeo, D-manose e é capaz de ligar as glicoproteínas fetuína e ovoalbumina. Portanto, Cvill é semelhante ao perfil da lectina ConA, apresentando a mesma especificidade por glicose e manose (LOSSIO *et al.*, 2017).

Alguns efeitos biológicos também foram descritos. Cvill mostrou toxicidade média contra náuplios de *Artemia* sp. e efeitos pró-inflamatórios em camundongos (LOSSIO *et al.*, 2017).

Efeitos antitumorais dessa lectina ainda não foram descritos. Portanto, tendo em vista o potencial antitumoral já demonstrado pelas lectinas leguminosas, verifica-se a importância de um estudo sistemático de Cvill frente a perspectiva de uma atividade citotóxica.

## 2 HIPÓTESE

A lectina Cvill produz efeito citotóxico na linhagem celular C6 por possuir homologia estrutural e de afinidade a carboidratos com a lectina ConA.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos biológicos, com destaque nas propriedades citotóxicas, da lectina Cvill purificada de sementes da leguminosa *Canavalia villosa* em células de glioma C6.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito citotóxico de Cvill, relativo à diminuição da viabilidade celular na linhagem de glioma C6;
- Analisar possíveis efeitos de Cvill sobre a morfologia das células C6;
- Avaliar se o efeito citotóxico de Cvill sobre a linhagem C6 é dependente de sua estrutura tridimensional e do domínio de ligação a carboidratos;
- Investigar o possível efeito citostático de Cvill sobre a linhagem C6 relativo à migração/proliferação;
- Avaliar a resistência da linhagem C6 frente ao tratamento intermitente com Cvill;
- Investigar tipos de morte celular após o tratamento com Cvill na linhagem C6;
- Avaliar possíveis alterações no potencial de membrana mitocondrial na linhagem C6 pelo tratamento com Cvill.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CULTURA DE CÉLULAS

Para representar um modelo *in vitro* de glioma, foi utilizado células da linhagem C6 (de rato Wistar; *Rattus norvegicus*). As células foram mantidas em cultura em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Low- glucose) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>.

### 4.2 LECTINAS: PURIFICAÇÃO, DISSOLUÇÃO, DILUIÇÃO, DESNATURAÇÃO E BLOQUEIO

A lectina Cvill foi purificada das sementes da leguminosa *Canavalia villosa*. O processamento das sementes e o fracionamento da lectina seguiu a metodologia descrita por Moreira e Cavada (1984). A purificação da lectina foi realizada pelo Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

A lectina purificada e liofilizada enviada ao nosso laboratório foi dissolvida em tampão Hepes-salina sem glicose (NaCl 124mM, KCl 4mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2mM, HEPES 25mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, pH 7.4) e utilizada para os tratamentos em cultura de células tumorais de glioma C6. Antes do tratamento, as concentrações finais desejadas (10, 30, 50 e 100µg/mL) foram obtidas diluindo a solução estoque de lectina pela adição do mesmo tampão.

Para o tratamento com a lectina desnaturada, a lectina dissolvida foi submetida durante 10min a uma temperatura de 100°C em banho-seco.

A fim de bloquear o domínio de reconhecimento a carboidratos da lectina, a proteína liofilizada foi dissolvida e diluída em tampão HEPES-salina contendo 0,1M de seu açúcar ligante específico ( $\alpha$ -metil-D-manosídeo) sendo mantida neste meio por 30min a 37°C antes dos ensaios.

### 4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E MICROSCOPIA

O ensaio de viabilidade celular, proposto por Mosmann (1983), consiste na avaliação da redução do MTT (sal de tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) por enzimas mitocondriais nas células metabolicamente ativas.

Para este ensaio, placas de 96 poços foram semeadas com  $10^4$  células/poço. O número de células foi obtido por meio de contagem em câmara de Neubauer. As placas foram incubadas por 24h, a  $37^\circ\text{C}$ , em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  e então tratadas com diferentes concentrações da lectina Cvill ou com Hepes-salina (veículo). Após o tratamento, as placas foram incubadas nas mesmas condições por 1, 3, 6, 12, 24 ou 48h. Para o tempo de 48h o meio era trocado antes de aplicar o tratamento.

Após o período de tratamento, foi realizada a captura de imagem com câmera digital acoplada a microscópio invertido (Nikon Eclipse T2000-U). Posteriormente, o conteúdo de cada poço foi substituído por 100 $\mu\text{L}$  de uma solução de MTT (0,5mg/mL em tampão HBSS) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 1h. Em seguida, o MTT foi retirado e adicionado 100 $\mu\text{L}$  de DMSO para a dissolução dos cristais de formazana e incubados na estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 30min. Após este período, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 TECAN) no comprimento de onda de 540nm.

Os valores de absorbância foram convertidos em porcentagem e expressos como porcentagem de viabilidade celular relativo ao controle (células tratadas com veículo considerado 100% de viabilidade).

#### 4.4 ENSAIO DE RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO

Este ensaio foi realizado com dois objetivos: 1) analisar se as células C6 são capazes de se regenerar após o tratamento com Cvill seguido de um período sem tratamento e 2) analisar se tratamentos intermitentes perdem sua eficácia.

Em placas de 96 poços,  $10^4$  células por poço foram semeadas e após 24h foram tratadas por um período de 24h. Imagens das mudanças morfológicas foram capturadas por microscopia de luz convencional através do aparelho Nikon Eclipse T2000-U. Posteriormente, o meio de cultura foi trocado por um novo meio sem tratamento e as células mantidas por mais 24h. Imagens novamente foram capturadas a fim de analisar a capacidade de regeneração das células na ausência da lectina. Após este período de 24h sem tratamento, as células foram novamente tratadas por 24h, para avaliar se uma segunda exposição ao tratamento teria o mesmo efeito; o que foi avaliado por fotografias e pelo ensaio de viabilidade celular através da redução do sal MTT (Figura 4).



**Figura 4 – Diagrama do ensaio de resistência.** Esquema do tratamento intermitente com a lectina Cvill em células C6.

#### 4.5 ENSAIO DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COM LARANJA DE ACRIDINA

Como um primeiro indicativo do processo de autofagia foi utilizado o corante laranja de acridina (LA) que se acumula em organelas vesiculares ácidas (OVAs) de maneira dependente de pH. O aumento das OVAs sugere a ocorrência do processo de autofagia, uma vez que autofagossomos e autolisossomos são organelas ácidas.

Para tanto, placas de 96 poços foram semeadas com  $10^4$  células/poço e incubadas. Passado 24h, as células foram tratadas com veículo ou lectina nas concentrações 10, 30, 50 e  $100\mu\text{g/mL}$  e novamente incubadas por 24h.

Após o período de tratamento, foi retirado  $50\mu\text{L}$  do meio de cada poço e adicionado  $50\mu\text{L}$  de laranja de acridina ( $10\mu\text{g/mL}$ ). Aguardado 20min da aplicação do LA ao abrigo de luz, capturou-se as imagens por meio de microscópio invertido de fluorescência Nikon Eclipse T2000-U utilizando o seguinte conjuntos de filtros: 470nm excitação e 525nm emissão para análise da integridade da cromatina (CR, em verde), e 350nm excitação e 615nm emissão para análise das OVAs (em vermelho).

A fim de quantificar a presença de OVAs, as imagens foram analisadas através do *software* livre ImageJ®. Os valores da fluorescência foram convertidos em porcentagens após a média de fluorescência das OVAs por CR.

#### 4.6 ENSAIO DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COM IODETO DE PROPÍDIO

Para análise da perda de integridade de membrana, foi realizado um ensaio de microscopia de fluorescência com iodeto de propídio (IP).

Para tanto, placas de 96 poços foram semeadas com  $10^4$  células/poço e incubadas. Passado 24h, as células foram tratadas com veículo ou lectina nas concentrações 10, 30, 50 e  $100\mu\text{g/mL}$  e novamente incubadas por 24 h. Os corantes IP (Sigma Aldrich®, Brasil, P4170) ( $1\text{mg/mL}$ ) e Hoechst (Sigma Aldrich®, Brasil, H33258)

(1mg/mL) foram então acrescentados no meio de cultivo, na concentração final de 0,01mg/mL.

Após 20 min da aplicação do LA ao abrigo de luz, capturou-se as imagens por meio de microscópio invertido de fluorescência Nikon Eclipse T2000-U. Foi utilizado o seguinte conjunto de filtros: 488nm excitação e 560nm emissão para IP (em vermelho) e 353nm excitação e 483nm emissão para Hoechst (em azul).

#### 4.7 ENSAIO DE MIGRAÇÃO/PROLIFERAÇÃO

Para o ensaio de migração/proliferação foram utilizadas placas de 24 poços com densidade de 150.000 células por poço. Após 24h, uma área de células no centro de cada poço foi removida utilizando ponteira de 200μL. Este espaço foi criado a fim de verificar o quanto que o tratamento seria capaz de inibir a migração/proliferação das células.

Os poços foram fotografados (tempo 0h) e as células tratadas com veículo ou lectinas nas concentrações de 10μg/mL e 30μg/mL. Concentrações superiores do tratamento não foram utilizadas, pois observou-se grande perda de adesão das células o que comprometeria a avaliação específica do processo de migração/proliferação. Após 24 e 48h, os poços foram novamente fotografados. Para a quantificação, o tamanho do espaço aberto (sem células) de cada tempo foi calculado utilizando o programa ImageJ.

#### 4.8 ANÁLISE DE MORTE CELULAR APOPTÓTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para avaliar o potencial das lectinas em gerar morte celular do tipo apoptótica foi realizado o ensaio Anexina/Iodeto de Propídio por citometria de fluxo. Para isso, células foram semeadas na densidade de  $5 \times 10^5$  por poço em placa de 6 poços e posteriormente tratadas com Cvill por 6h.

A cada dois poços, as células foram tripsinizadas e unidas para obter a concentração final de  $10^6$  células por amostra. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5min a 1.500 rpm e ressuspensas em 200 μL de tampão de ligação (10mM HEPES, 140mM NaCl e 25mM de  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4). A seguir, foram adicionados 2μL de Anexina V e 2μL de Iodeto de Propídio (1mg/mL) em todas as amostras.

As amostras controle (veículo) e tratadas com Cvill foram duplamente marcadas. Além disso, foram realizados uma série de controles que incluíram: branco (sem marcação ou tratamento), controle

positivo para Anexina V (marcado com Anexina V e previamente tratada com Staurosporina 1 $\mu$ M por 6h), controle negativo para Anexina V (marcado com Anexina V e sem tratamento), um controle negativo para iodeto de propídio (marcado com iodeto de propídio e sem tratamento), um controle positivo para iodeto de propídio (marcado com iodeto de propídio e células submetidas ao nitrogênio líquido por 20min).

As células foram então incubadas por 15min ao abrigo da luz. A leitura foi realizada no Aparelho FACS Canto (Becton Dickson®) e para cada amostra foi contabilizado um total de 10.000 eventos. Após a leitura, os dados foram submetidos à análise no *software* livre Flowing 2.5.1® utilizando os canais FITC e PE para análise de Anexina V e Iodeto de Propídio respectivamente.

Foram consideradas células em apoptose aquelas marcadas apenas com Anexina V ou duplamente marcadas com Anexina V + Iodeto de Propídio.

#### 4.9 DETECÇÃO DA PROTEÍNA AUTOFÁGICA LC3 POR WESTERN BLOT

Com o intuito de verificar uma possível indução do processo autofágico por um método mais preciso do que a coloração por LA, foi realizada uma análise da expressão da proteína LC3, presente na membrana dos autofagossomos, por meio do ensaio de *Western blot*.

##### 4.9.1 Preparação de amostras

Para o preparo das amostras para a técnica de *Western blot*, uma população de 3 x 10<sup>5</sup> células C6 foi semeada em placa de cultura de 6 poços, contendo meio de cultura DMEM por 24h. As células receberam tratamento de 12 h em contato com Cvigil. Após o tratamento, as células foram suspensas em 200 $\mu$ L de SDS-stop solution (4% SDS, 2mM EDTA, 50mM Tris, pH 6,8) por poço. Com o auxílio de raspadores (*cell scraper*) as células foram descoladas da superfície das placas. Posteriormente, os extratos celulares foram transferidos para microtubos de 1,5mL, previamente identificados, e fervidos por 5min a 100°C. Após agitação em vórtex, as amostras foram centrifugadas por 10min a 13.000rpm. Após retirada de alíquotas para dosagem de proteína, as amostras receberam tampão (40% glicerol, 50mM Tris, azul de bromo fenol) na proporção de 25:100 (v/v) e  $\beta$ -mercaptoetanol (concentração



final 8% v/v). O conteúdo de proteína foi quantificado através do método de Lowry modificado (PETERSON, 1977). Os extratos foram congelados em freezer -80 °C até seu uso.

#### 4.9.2 Separação das proteínas em gel SDS-PAGE

As proteínas foram separadas através de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS) uni-dimensional na concentração de 12% e posteriormente foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose. Após essa transferência foi realizado o bloqueio desta membrana, lavagem e incubação com anticorpo primário dirigido para a proteína LC3I (16 kDa) e LC3II (14 kDa) (Cell Signaling®, #12741). As membranas passaram por diversas lavagens, seguida da incubação com anticorpo secundário ligado a enzima peroxidase. Após novas lavagens a membrana foi incubada com Super ECL (General Electric®), e o sinal de quimioluminescência foi capturado utilizando o aparelho Fotodocumentador ChemiDoc (Bio Rad®). As bandas das proteínas foram quantificadas utilizando o programa ImageLab 5.0. (RIEGER *et. al.*, 2016).

#### 4.10 MEDIDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL COM A SONDA JC-1

JC-1 é uma sonda empregada para mensurar o potencial de membrana mitocondrial e foi utilizada por Reers e colaboradores (1991). JC-1 exibe acúmulo dependente de potencial na mitocôndria. Aquelas com baixo potencial da membrana mitocondrial emitem fluorescência verde (525nm) devido à formação de monômeros, enquanto que em alto potencial, esses monômeros se agrupam formando J-agregados, que emitem fluorescência vermelha (590nm). Consequentemente, a despolarização mitocondrial é indicada por uma diminuição na razão da intensidade de fluorescência vermelha/verde.

Para este ensaio, placas de 96 poços foram semeadas com  $10^4$  células/poço e, posteriormente, tratadas com Cwll. O FCCP (carbonil cianeto trifluoro-metoxi fenilhidrazona) foi utilizado como controle positivo (concentração final de 20mM) pela capacidade de despolarizar o potencial da membrana mitocondrial. Trata-se de um potente desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial que desfaz o gradiente eletroquímico e interrompe, portanto, a síntese de ATP.

Após 6h de tratamento foi adicionado 100µL da sonda JC-1 (1mg/ml) em cada poço e as células foram mantidas na estufa a 37°C

por 20min ao abrigo de luz. As células foram então lavadas com PBS 0,1M e adicionou-se 100 $\mu$ L do mesmo tampão para a leitura no espectrofotômetro e registros microscópicos. A leitura foi feita com excitação de 488 nm, emissão de 520nm para os monômeros JC-1 (verde) e emissão de 595nm para os J-agregados (vermelho).

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

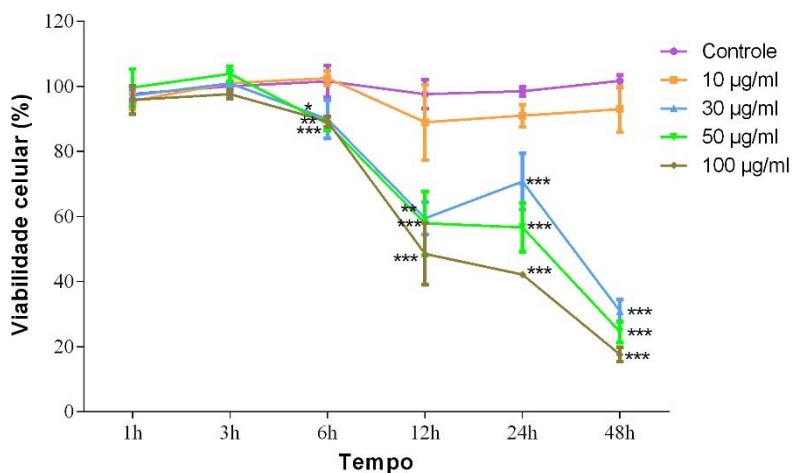
Para cada teste, foram realizados 4 experimentos independentes em triplicata. Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) e foram analisados pela ANOVA de uma ou duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . A análise dos resultados foi realizada no *software* GraphPad Prism versão 5.0 (La Jolla, Califórnia, EUA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Cvill DIMINUI A VIABILIDADE CELULAR E CAUSA MUDANÇAS MORFOLÓGICAS NA LINHAGEM C6

O potencial efeito citotóxico de Cvill sobre as células C6 foi inicialmente investigado pelo método do MTT. De acordo com esse método, verificou-se que Cvill é capaz de diminuir a viabilidade celular a partir do tempo de 6h na concentração de 30 $\mu$ g/mL. A concentração de 10 $\mu$ g/mL não diminuiu a viabilidade em nenhum tempo de tratamento. Observa-se a diminuição da viabilidade celular de maneira tempo-dependente e nos tempos de 24 e 48h fica evidente a forma concentração-dependente na diminuição da viabilidade celular (Figura5).

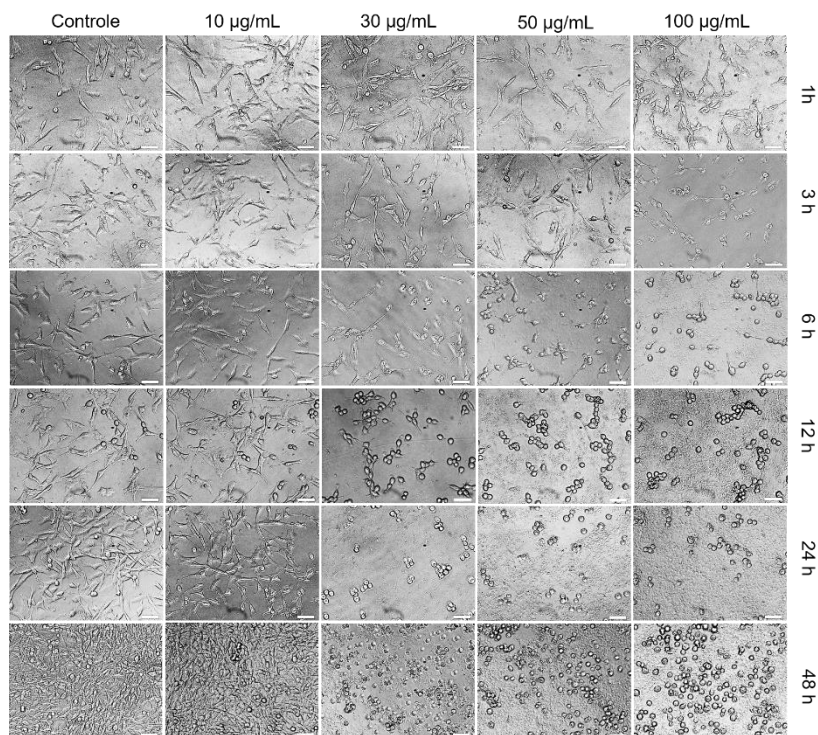
Principalmente nos tempos 24 e 48h observa-se uma maior diferença entre os valores do controle e os tratamentos de 30, 50 e 100 $\mu$ g/mL (Figura 5). Ressalta-se, porém, que essa diferença se refere não só a perda de células viáveis, mas também a proliferação que está ocorrendo principalmente no controle (Figura 6); fato que pode estar associado a ampliação das diferenças encontradas.



**Figura 5 – Efeito da lectina Cvill na viabilidade celular.** Células C6 foram plaqueadas na concentração de  $10^4$  e expostas a veículo (HEPES; controle) ou a tratamento com a lectina Cvill (10, 30, 50 e 100 $\mu$ g/mL) por 1, 3, 6, 12, 24 e 48h. \* $p < 0,5$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .

Nos registros de microscopia de luz, realizados também nos tempos de 1, 3, 6, 12, 24 e 48h, encontramos alterações morfológicas. As alterações mais evidentes foram: retração de prolongamentos (desde um encurtamento mais discreto até células totalmente esféricas) e, possivelmente, degradação da matriz extracelular (apresentando-se como um fundo granuloso).

A partir de 3h na concentração de 100µg/mL, já se observa mudanças sutis. Mudanças morfológicas mais evidentes foram encontradas a partir de 6h assim como no ensaio de viabilidade celular. De forma tempo e concentração dependente, as células adquiriram um formato cada vez mais esférico assim como um fundo cada vez mais granuloso (Figura 6), que coincidiram com os resultados observados pela análise da viabilidade pelo método do MTT (Figura 5).



**Figura 6 – Morfologia das células C6 após tratamento.** Células C6 foram plaqueadas na concentração de  $10^4$  e submetidas a tratamento com veículo (HEPES; controle) ou com lectina Cvill por 1, 3, 6, 12, 24 e 48h de exposição. Barra de Escala: 50 µm.

Avaliando a ação da Cvill sobre a viabilidade celular (MTT) observa-se que ela causou diminuição significativa da viabilidade celular na concentração de 30µg/mL que começa a partir de 6h e se intensifica em 24 e 48h (Figura 5).

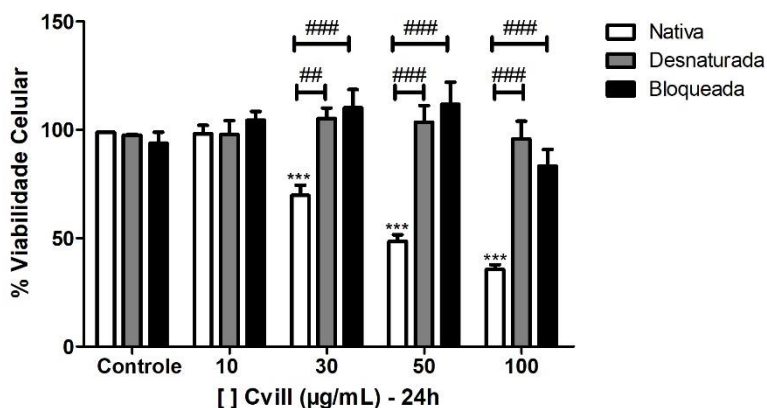
Esse efeito quando comparado a diminuição da viabilidade celular induzida por outras lectinas, mostra que Cvill é mais potente que CaBo, DlyL e ConV. Considerando que após 24h CaBo e DlyL apresentaram diminuição da viabilidade celular somente a partir de 50µg/mL e ConV apenas em 100µg/mL (CAVADA *et. al.*, 2018; LEAL *et. al.*, 2018; OSTERNE *et al.*, 2017). Verificando o mesmo quesito, DLL é mais potente que Cvill, pois a partir de 10 µg/mL já apresenta diminuição da viabilidade celular (NASCIMENTO *et. al.*, 2017). Já em comparação com as lectinas DVL e ConA, observa-se que Cvill apresenta um perfil de diminuição da viabilidade celular similar (NASCIMENTO *et. al.*, 2018).

Cabe destacar, que apesar de estarmos verificando a citotoxicidade, as lectinas também são pesquisadas quanto a neuroproteção. Em um trabalho publicado por Rieger e colaboradores (2016), ConBr, uma lectina extraída das sementes de *Canavalia brasiliensis*, mostrou efeito neuroprotetor nas concentrações de 0,1µg/mL e 1µg/mL em fatias organotópicas do hipocampo submetidas a submetidas a privação de oxigênio e glicose (POG).

## 5.2 O EFEITO CITOTÓXICO DE Cvill SOBRE A LINHAGEM C6 É DEPENDENTE DE SUA ESTRUTURA TERCIÁRIA E DE SEU CRD

A fim de verificar se o efeito citotóxico observado anteriormente (Figura 5) depende de sua estrutura terciária ou de seu domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD), células C6 foram tratadas por 24h com Cvill desnaturada ou bloqueada com seu açúcar específico ( $\alpha$ -metil-D-manosídeo).

Os resultados obtidos mostram que o efeito citotóxico depende tanto da estrutura terciária da lectina quando de seu CRD já que nessas situações não houve diminuição da viabilidade celular conforme obtido com Cvill nativa (Figura 7).



**Figura 7 - Viabilidade Celular após tratamento com Cvill desnaturada ou bloqueada.** Células de glioma C6 foram tratadas com veículo (HEPES; controle) ou com Cvill desnaturada ou bloqueada com  $\alpha$ -metil-D-manosídeo por 24h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT. \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado o tratamento com lectina nativa ao veículo (controle); ### $p < 0,01$  quando comparado o tratamento com lectina desnaturada ou bloqueada ao tratamento com lectina nativa na mesma concentração; ### $p < 0,001$  quando comparado o tratamento com lectina desnaturada ou bloqueada ao tratamento com lectina nativa na mesma concentração.

### 5.3 A LINHAGEM C6 APRESENTA RESISTÊNCIA FRENTE AO TRATAMENTO COM 30µg/mL DE Cvill

Com o intuito de investigar se células que sobreviveram após um primeiro tratamento tornavam-se resistentes após tratamentos subsequentes e intermitentes foi realizado um ensaio de resistência ao tratamento.

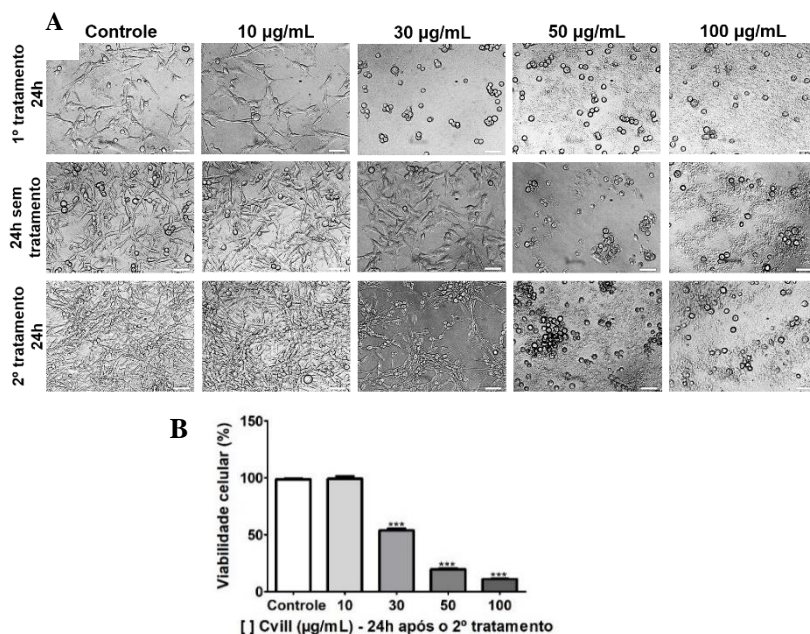
Após 24h do primeiro tratamento com Cvill, a morfologia das células foi registrada por microscopia de luz. Conforme já retratado, nesse tempo, as células tornam-se esféricas nas concentrações de 30, 50 e 100µg/mL (Figura 8A, primeira linha).

O tratamento foi então retirado e as células permaneceram 24h sem tratamento. Após este período, observou-se que as células que haviam sido tratadas por 30µg/mL voltaram à sua morfologia original. Já as células que haviam sido tratadas com 50 e 100µg/mL mantiveram

a característica esférica, mesmo após o tratamento ter sido retirado (Figura 8A, segunda linha).

A segunda exposição à lectina Cvill não demonstrou a mesma potencialidade do primeiro tratamento na concentração de 30µg/mL. Diferente do primeiro tratamento, as células não perderam seus prolongamentos (Figura 8A, terceira coluna).

Apesar disso, quando feito um teste de viabilidade ao final deste ensaio, verificou-se que a viabilidade celular na concentração de 30µg/mL era menor do que o controle (Figura 8B). Junto com os dados microscópicos, percebe-se que esta diminuição se refere na verdade há uma menor densidade celular, sugerindo que, apesar das células não responderem da mesma maneira no segundo tratamento, houve um atraso na proliferação celular (Figura 8A, terceira linha).



**Figura 8 - Resistência ao tratamento intermitente.** (A) As células foram tratadas por 24h e mudanças na morfologia foram verificadas a partir de 30µg/mL (primeira linha). O meio com tratamento foi substituído por um meio sem tratamento e, após 24h, as células que haviam sido tratadas com 30µg/mL voltaram a morfologia original (segunda linha). Um segundo tratamento nessas mesmas células não obteve a mesma potencialidade do primeiro (terceira linha). (B) Mostra a viabilidade das células após o 2º tratamento. Barra de escala: 50µm. \*\*\*p<0,001

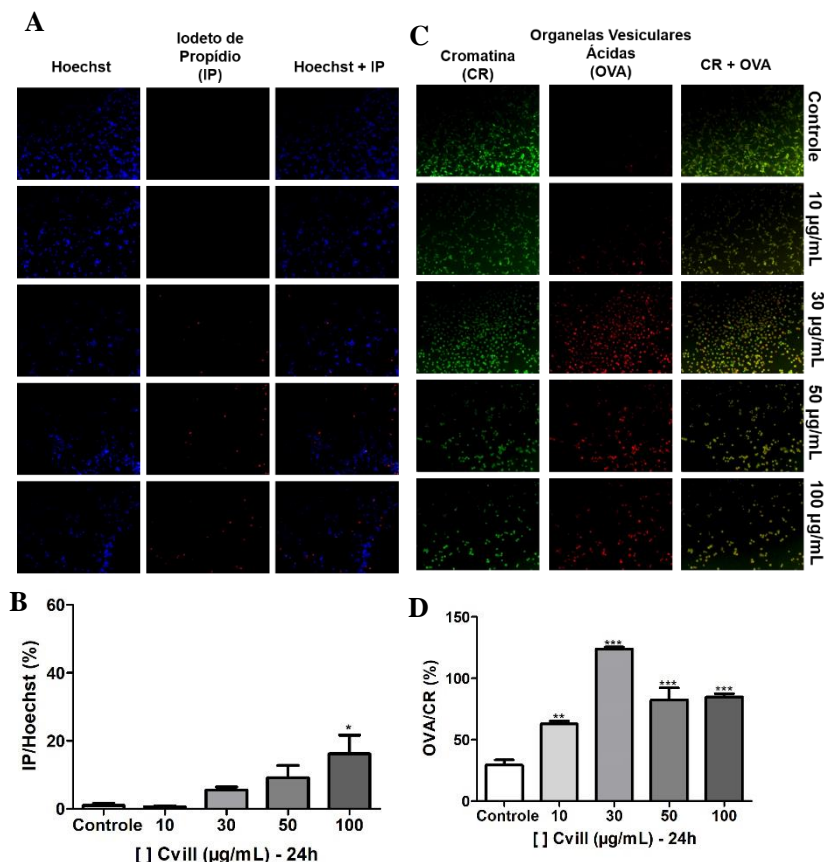
O que se verificou por este experimento na concentração de 30µg/mL vem ao encontro da literatura no sentido de que as células podem se recuperar mesmo estando à beira de um início de morte celular (GUDIPATY *et. al.*, 2018). Esse processo é denominado anastasis quando a recuperação é de células em processo de apoptose - mesmo após ativação de caspases executoras (SUN; MONTELL, 2017)

Dois ensaios, realizados a partir da incorporação de iodeto de propídio e de laranja de acridina, podem esclarecer um pouco sobre o que estaria ocorrendo.

Observa-se que após o tratamento de 30µg/mL por 24h, a incorporação de iodeto de propídio é de apenas 5,5% (Figura 9A e 9B), o que demonstra poucas células com membrana plasmática rompida em estágio avançado de morte celular, e dessa maneira com mais chance de recuperação.

Outro ponto a ser destacado é a presença de um pico de organelas vesiculares ácidas no tratamento com 30µg/mL por 24h (Figura 9C e 9D), o que pode representar uma alta atividade autofágica associada a sobrevivência já que as células se recuperaram nessa dose quando é retirado o tratamento (Figura 8).



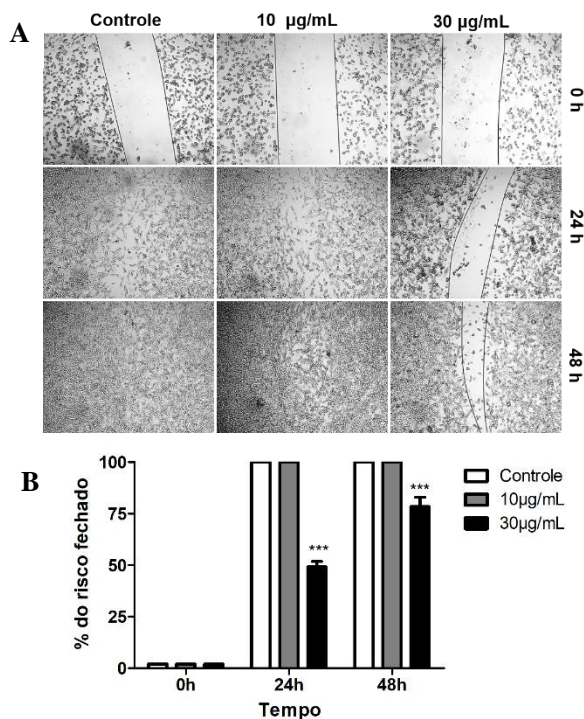


**Figura 9 – Incorporação de Iodeto de Propídio e formação de organelas vesiculares ácidas.** Células C6, foram tratadas com veículo (Hepes) ou com Cvill nas concentrações de 10, 30, 50 e 100µg/mL por 24h e posteriormente coradas com Hoescht e Iodeto de Propídio (A, B) ou com Laranja de Acridina (C, D). As imagens foram capturadas através do microscópio de fluorescência invertido (A, C) e analisadas através do *software* Image J (B, D). Aumento de 10X. \* $p < 0,5$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 5.4 Cvill POSSUI EFEITO CITOSTÁTICO NA LINHAGEM C6

Além do efeito citotóxico, foi analisada a capacidade da lectina Cvill em exercer um efeito citostático, resultado muito importante já que uma das características marcantes do glioma é a invasão de tecidos adjacentes.

Os resultados mostram que na concentração de 30 $\mu$ g/mL a lectina Cvill foi capaz de inibir a migração/proliferação em 50% em 24h e em 22% em 48 h em relação ao controle (Figura 10).



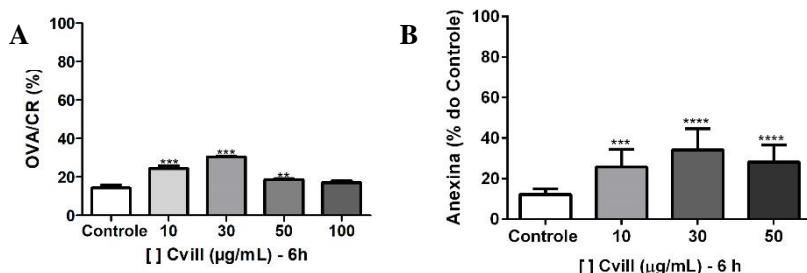
**Figura 10 – Efeito citostático na migração/proliferação.** (A) Células C6 visualizadas por microscopia óptica após abertura de um espaço no centro de cada poço (0h) e após o tratamento com a lectina Cvill por 24 e 48h. As imagens representam o efeito da Cvill na migração/proliferação celular e as linhas presentes na fotografia foram colocadas para delimitar a área não coberta por células. (B) Quantificação do efeito anti-migração de Cvill, onde os valores indicam a porcentagem do espaço que fechou após 24 e 48h de tratamento. \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

## 5.5 Cvill INDUZ APOPTOSE E AUTOFAGIA NA LINHAGEM C6

A fim de verificar o tipo de morte celular induzida por Cvill, foi utilizado Anexina V que se liga a fosfatidilserina externalizada,

indicativo de morte celular apoptótica, e Laranja de Acridina que cora organelas vesiculares ácidas, um indicativo de autofagia.

Em apenas 6h de tratamento, verificou-se um aumento da marcação por Anexina V indicando que o tratamento induz a apoptose (Figura 11A). No mesmo período de tratamento, também foi constatado um aumento das organelas vesiculares ácidas, sugerindo que a autofagia também está ocorrendo (Figura 11B).



**Figura 11 – Indução de autofagia e apoptose.** As células foram tratadas com Cvill por 6h. Após esse período, foram expostas a Laranja de Acridina (A) ou Anexina V (B) sugerindo processos de autofagia e apoptose respectivamente. \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$

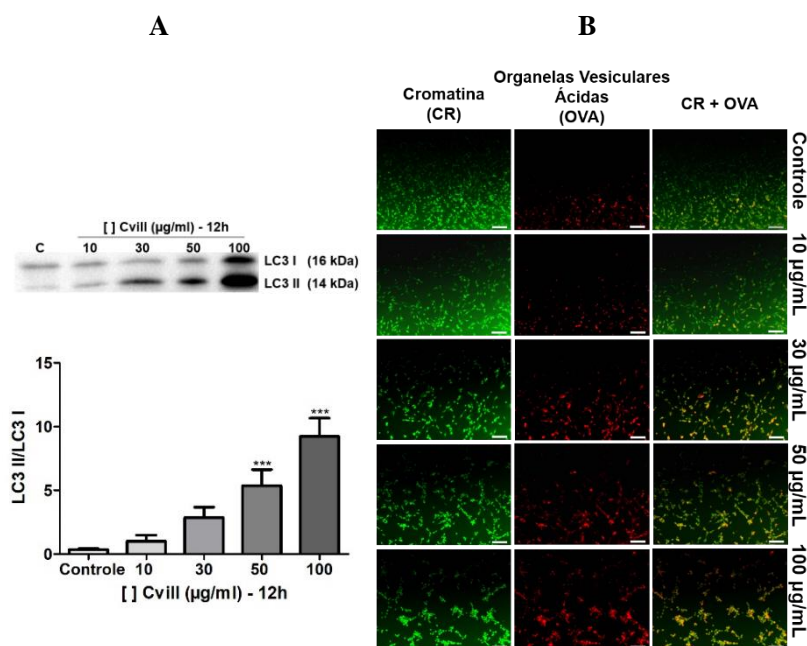
Portanto, sugere-se que tanto a apoptose quanto a autofagia podem estar ocorrendo e que esses mecanismos podem estar interagindo devido ao perfil encontrado, onde ocorre um pico na concentração de 30µg/mL para ambos os marcadores (Figura 11). Outros compostos também desencadeiam os dois tipos de morte celular (YU *et. al*, 2017). Já é descrito que uma resposta inicialmente autofágica, pode ser transformada em uma resposta apoptótica (DERETIC; KLIONSKY, 2008), o que também é plausível por esses resultados.

Após observar o incremento das organelas vesiculares ácidas, optou-se por investigar, por um método mais confiável - já que LA cora não somente as vesículas autofágicas, se o processo autofágico estaria de fato ocorrendo. Para tanto, foi verificado a expressão da proteína LC3, que se encontra associada à membrana autofágica.

Foi observado que a lectina Cvill foi capaz de induzir a clivagem da LC3 I (16 kDa) em LC3 II (14 kDa), indicando que existe uma modulação significativa por parte das lectinas a partir de 50µg/mL em 12h de tratamento (Figura 12A). Utilizando o mesmo tempo de tratamento, 12h, verificou-se por meio da coloração com Laranja de

Acridina uma correspondência no aumento das organelas vesiculares ácidas (Figura 12B).

Com estes resultados é possível concluir que de fato o tratamento da linhagem C6 com a lectina Cvill está envolvida na indução do mecanismo autofágico. Apesar disso, não sabemos se a autofagia aqui estaria contribuindo para a sobrevivência ou morte celular. Para tanto, ensaios de viabilidade celular utilizando bloqueadores do processo autofágico, como cloroquina e 3-MA (3-metiladenina), são importantes para esclarecer o papel citoprotetor ou citotóxico da autofagia induzida por Cvill.

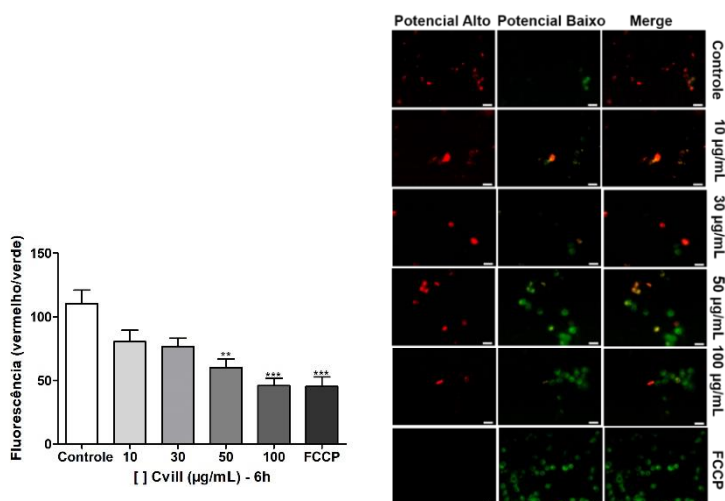


**Figura 12 - Expressão proteica de LC3 e incremento de OVAs.** A) Células C6 foram plaqueadas na densidade de  $2,5 \times 10^5$  tratadas com Cvill por 12h e submetidas a *Western blot* para imunodeteção do anticorpo LC3. As análises estatísticas e a captura das imagens foram realizadas com o Software ImageLab  $***p < 0,001$ . B) Células C6, foram plaqueadas na densidade de  $10^4$  células/poço e após 12h coradas com Laranja de Acridina. As células foram visualizadas através de microscopia de fluorescência. Barra de escala: 50µm.

## 5.6 Cvill DIMINUI O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi_m$ ) NA LINHAGEM C6

Com o intuito de investigar se os efeitos ocasionados pelas lectinas sobre a linhagem C6 poderia estar relacionado a algum dano causado à mitocôndria, as células foram submetidas à coloração com a sonda JC-1.

De acordo com as imagens apresentadas a seguir, observamos que ocorreu uma marcação mais acentuada da coloração verde nas células tratadas a partir da concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , bem como uma diminuição da razão vermelho/verde (gráfico), indicando diminuição do potencial de membrana mitocondrial (Figura 13) e, portanto, comprometendo a maquinaria energética da célula. Nota-se que a viabilidade celular também diminui em 6h pelo método da redução do MTT por enzimas mitocondriais (Figura 5).



**Figura 13 – Alteração do potencial de membrana mitocondrial.** Células C6 plaqueadas na densidade de  $10^4$  e, após 24h, tratadas com Cvill. Como controle positivo foi utilizado o desacoplador mitocondrial FCCP (1  $\mu\text{M}$ ). As células permaneceram por 6h em contato com a lectina e posteriormente foram coradas com a sonda JC-1. A leitura no espectrofotômetro foi realizada e a fluorescência emitida também foi visualizada por microscopia de fluorescência. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ . \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados revelaram importantes características citotóxicas da lectina Cvill, pois, além de induzir a morte celular também inibiu parcialmente a migração/proliferação das células C6 de glioma.

Estes efeitos biológicos da lectina Cvill sobre a linhagem celular C6 foram bem evidenciados através da detecção de um efeito citotóxico claramente dependente da sua estrutura terciária/quaternária, bem como do domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD). Adicionalmente, em períodos de incubação precoces (6 e 12h), foi observado um aumento da marcação das organelas vesiculares ácidas (OVAs), bem como aumento da proteína LC3 II (associada a membrana das vesículas autofágicas), após as células C6 serem tratadas com Cvill por um período de 12h. Em conjunto estes dados indicam a indução do processo autofágico pela lectina. Após 6h de tratamento, o processo de apoptose também foi detectado pela ligação da anexina V à fosfatidilserina externalizada no início do processo e, associado a esta marcação, a incorporação de iodeto de propídio no final do processo apoptótico. Portanto, os resultados indicam que a autofagia e a apoptose podem estar ocorrendo e de forma simultânea.

Também foi verificado que o tratamento com a lectina diminui o potencial da membrana mitocondrial a partir do tempo de 6h, o que compromete a maquinaria energética da célula.

Acompanhando todas estas mudanças, temos a morfologia das células sendo alteradas de modo tempo e concentração dependente o que inclui a retração dos prolongamentos citoplasmáticos até uma forma esférica e também provável degradação da matriz extracelular.

Através da observação da morfologia foi realizado um ensaio de resistência ao tratamento com Cvill. Dentro deste paradigma foi verificado que as células que haviam adquirido forma esférica com 30µg/mL de Cvill por 24h, tiveram sua morfologia recuperada (com prolongamentos) após retirado o tratamento por 24h. Além disso, verificou-se que um segundo tratamento pelo mesmo período, não causou a mesma alteração morfológica obtida na primeira exposição; sugerindo uma resistência celular para a dose de 30µg/mL, apesar da observação de um atraso na proliferação celular neste segundo tratamento.

A partir dos dados apresentados neste trabalho, sugere-se outros ensaios para melhor compreensão das modulações causadas pela lectina. Dentre eles destacam-se ensaios mais específicos que avaliem a proliferação celular, especialmente na concentração de 30µg/mL,

utilizando, por exemplo, o Kit comercial CyQUANT; ensaios para verificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS); ensaios de viabilidade celular utilizando bloqueadores do processo autofágico, como cloroquina e 3-MA (3-metiladenina), para elucidar o papel citoprotetor ou citotóxico da autofagia induzida pela lectina. Além disso, outros estudos também serão fundamentais para elucidar o mecanismo de ação da lectina Cvill. Entre estes destacamos: caracterização de mais alvos das vias de morte celular; modulação de enzimas de sinalização envolvidas em eventos de morte e sobrevivência celular (ex. MAPKs e Akt); verificação da possibilidade de internalização da lectina e sua ação direta sobre a mitocôndria; identificação de alvos da superfície celular, que possam estar desencadeando sinais para o interior da célula, e que poderiam estar modulando vários dos parâmetros celulares descritos ao longo deste trabalho.

Assim, apesar das evidências do potencial citotóxico de Cvill apresentado neste trabalho, todos os estudos adicionais indicados serão fundamentais para avançar na elucidação do mecanismo de ação da lectina Cvill e para sua potencial utilização na terapia antitumoral.





## REFERÊNCIAS

ADAMSON, C. *et al.* Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 18, n. 8, p. 1061-1083, 2009.

ALIPI, A. M. H.; PICHARDO, J. M.; VIBRANS, H.. *Canavalia villosa* **Benth.** Disponível em:

<<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/canavalia-villosa/fichas/ficha.htm>>. Acesso em: 15 out. 2018.

AOYANAGI, E. *et al.* Clinicopathologic application of lectin histochemistry: bisecting GlcNAc in glioblastoma. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 18, n.6, p. 518-525, 2010.

ATCC. **C6**. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/all/CCL-107.aspx#generalinformation>>. Acesso em: 05 out. 2018.

BENDA, P. *et al.* Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science**, v. 161, n. 3839, p.370-371, 1968.

BIES, C.; LEHR, C-M.; WOODLEY, J.F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 425-435, 2004.

BOATRRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S.. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p.725-731, 2003.

CAVADA, B. *et al.* Revisiting proteus: Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons from and Potential Biotechnological Uses of the Diocleinae Subtribe Lectins. **Current Protein & Peptide Science**, v. 2, n. 2, p.123-135, 2001.

CAVADA, B. S. *et al.* *Canavalia bonariensis* lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antglioma potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p.369-378, 2018.

CHAABANE, W. *et. al.* Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v.61, n. 1, p.43-58, 2013.

CHERRY, A. E.; STELLA, N. G protein-coupled receptors as oncogenic signals in glioma: emerging therapeutic avenues. **Neuroscience**, v. 278, p. 222-236, 2014.

COOPER, K. F. Till Death Do Us Part: The Marriage of Autophagy and Apoptosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, n.1, p. 1-13. 2018.

CURTIN, J.F; COTTER, T.G. Apoptosis: Historical perspectives. **Essays in Biochemistry**, v.39, p. 1-10, 2003.

DEKKERS, M. P. J; NIKOLETOPOULOU, V.; BARDE, Y-a.. Death of developing neurons: New insights and implications for connectivity. **The Journal of Cell Biology**, v. 203, n. 3, p.385-393, 2013.

DERETIC, V.; KLIONSKY, D. J. Como as células limpam a casa. **Scientific American Brasil**, v. 1, n. 1, p.54-61, 2008.

DIKIC, I; ELAZAR, Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.19, n. 6, p.349-364, 2018.

FEIG, C.; PETER, M. e.. How apoptosis got the immune system in shape. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 1, p.61-70, 2007.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B.. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in câncer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 3, p.236-247, 2011.

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 12, p.1-24, 2015.

GROBBEN, B.; DEYN, P. D.; SLEGERS, H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. **Cell and Tissue Research**, v. 310, n. 3, p.257-270, 2002.

GUDIPATY, S. A. *et al.* Unconventional Ways to Live and Die: Cell Death and Survival in Development, Homeostasis, and Disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 34, n.1, p. 311-332, 2018.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n.5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1 , p. 57-70, 2000.

HERAS-SANDOVAL, D. *et al.* The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 12, p.2694-2701, 2014.

HRUBAN, R. *et al.* **What are Tumors**. Disponível em: <<http://pathology.jhu.edu/pc/BasicTypes1.php>>. Acesso em: 28 set. 2018.

IMMANUEL, V. *et al.* Variegated Colors of Pediatric Glioblastoma Multiforme: What to Expect? **Rare Tumors**, v. 9, n.2, p. 81-84. 2017.

INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, v.1, n. 1, p.1-128, 2017.

INCA. **Câncer: O que é o câncer**. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322#](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322#)>. Acesso em: 28 set. 2018a.

INCA. **Câncer: Perguntas e Respostas Sobre o Câncer**. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=83](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=83)>. Acesso em: 28 set. 2018b.

JACOBS, V. L. *et al.* Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. **Asn Neuro**, v. 3, n. 3, p.171-181, 2011.

JURATLI, T. A.; SCHACKERT, G.; KREX, D. Current status of local therapy in malignant gliomas - A clinical review of three selected approaches. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, n. 3, p.341-358, 2013.

KABEYA, Y. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **The Embo Journal**, v. 19, n. 21, p. 5720-5728, 2000.

LEAL, R. B. *et al.* Crystal structure of DlyL, a mannose-specific lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds that display cytotoxic effects against C6 glioma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, n. 2018, p.64-76, 2018.

LI, W-w. *et al.* Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, n. 2, p.282-286, 2011.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends In Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p.211-218, 2016.

LICHTENSTEIN, R. G.; RABINOVICH, G. A. Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. **Cell Death and Differentiation**, v.20, n. 8, p. 976-986, 2013.

LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J. **The Lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine**. 1.ed. Londres: Academic Press, 1986. 618 p.

LIN, L; BAEHRECKE, E. H. Autophagy, cell death, and cancer. **Molecular & Cellular Oncology**, v.2, n.3, p. 1-8, 2015.

LINDSTEN, T. *et al.* The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. **Molecular Cell**, v. 6, n. 6, p.1389-1399, 2000.

LOSSIO, C. F. *et al.* Lectin from *Canavalia villosa* seeds: a glucose/mannose-specific protein and a new tool for inflammation studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, n.1, p. 272-280, 2017.

LOUIS, D. N. *et.al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v.131, n.6, p. 803-820, 2016.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 386 p.

MASTERS, J. R.. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p.315-319, 2002.

MONTIEL, O. M. *Canavalia villosa* **Benth.** Disponível em: <<http://www.tropicos.org/name/13005100?projectid=7>>. Acesso em: 25 out. 2018.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum (PRAHA)**, v. 26, n.2, p.113-120, 1984.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NASCIMENTO, A. P. M. *et al.* Anti-glioma properties of DVL, a lectin purified from *Dioclea violacea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p.566-577, 2018.

NASCIMENTO, K.S. *et al.* Structural analysis of *Dioclea lasiocarpa* lectin: A C6 cells apoptosis-inducing protein. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 92, p.79-89, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274 p.

NOBEL. **The 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine – Press Release**. 2016. Disponível em:  
[<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2016/press-release/>](https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2016/press-release/).  
 Acesso em: 17 set. 2018.

OHGAKI, H. Epidemiology of brain tumors. **Methods in Molecular Biology**, v. 472, p. 323-342, 2009.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 4, p. 764-772. 2013.

OSTERNE, V. J. S. *et al.* Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p.271-282, 2017.

OSTROM, Q. T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. **Neuro-oncology**, v. 18, n. 5, p.1-75, 2016.

PALMA, P. R. Avaliação da Anexina V e Calceína AM como Marcadores de Apoptose em Linfócitos. **Dissertação**. 2005.

PAW, I. *et al.* Mechanisms regulating glioma invasion. **Cancer Letters**, v. 362, n. 1, p.1-7, 2015.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology**, v.109, n.2, p. 347-352, 1995.

PRATT, J.; ANNABI, B. Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAKS2/STAT3 and MT1-MMP signalin interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 5, p. 917-924, 2014.

PRATT, J.; ROY, R.; ANNABI, B. Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. **Glycobiology**, v. 22, n.9, p.1245-1255, 2012.

RIEGER, D. K. *et al.* ConBr, A Lectin Purified from the Seeds of *Canavalia brasiliensis*, Protects Against Ischemia in Organotypic Culture of Rat Hippocampus: Potential Implication of Voltage-Gated Calcium Channels. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 2, p.347-359, 2016.

RIOS-MARCO, P. *et al.* Cholesterol homeostasis and autophagic flux in perifosine-treated human hepatoblastoma HepG2 and glioblastoma U-87 MG cell lines. **Biochemical Pharmacology**, v. 96, n.1, p. 10-19, 2015.

ROOS, W. P.; THOMAS, A. D.; KAINA, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. **Nature Reviews. Cancer**, v. 16, n. 1, p. 20-33, 2015.

ROUSE, C. *et. al.* Years of potential life lost for brain and CNS tumours relative to other cancers in adults in the United States, 2010. **Neuro Oncology**, v. 18, n. 1, p. 70-77, 2016.

SATHORNSUMETEE, S.; RICH, J. N. New treatment strategies for malignant gliomas. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 6, n. 7, p. 1087-104, 2006.

SEGAWA, K; NAGATA, S. An Apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylserine Exposure. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n.11, p.639-650, 2015.

SIBENALLER, Z. A. *et al.* Genetic characterization of commonly used glioma cell lines in the rat animal model system. **Neurosurgical Focus**, v. 19, n. 4, p.1-9, 2005.

STUMMER, W. *et al.* Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial.. **The Lancet: Oncology**, v. 7, n. 5, p.392-401, 2006.

SUN, G.; MONTELL, D. J. Q&A: Cellular near death experiences-what is anastasis? **Bmc Biology**, v. 15, n. 1, p.1-5, 2017.

TAIT, S. W.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell signalling. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 4, p.807-815, 2012.

VAN DAMME, E. J. *et al.* Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

VAN DAMME, E.J.M. *et al.* Ribosome-Inactivating Proteins: a family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 20, n.5, p. 395-465. 2001

WEINBERG, R. A. **A Biologia do Câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 844 p.

WOJTON, J.; MEISEN, W. H.; KAUR, B. How to train glioma cells to die: molecular challenges in cell death. **Journal of Neuro-oncology**, v.126, n. 3, p.377-384, 2015.

YING, X. *et al.* The construction of the multifunctional targeting ursolic acids liposomes and its apoptosis effects to C6 glioma stem cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 38, p.64129-64142, 2017.

YU, S.N. *et al.* Salinomycin induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and apoptosis through generation of reactive oxygen species in human glioma U87MG cells. **Oncology Reports**. v.37, n.6, p.3321-3328, 2017.

ZONG, H; PARADA, L. F; BAKER, S. J. Cell of origin for malignant gliomas and its implication in therapeutic development. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**. v. 7, n. 5, p. 1-12, 2015.